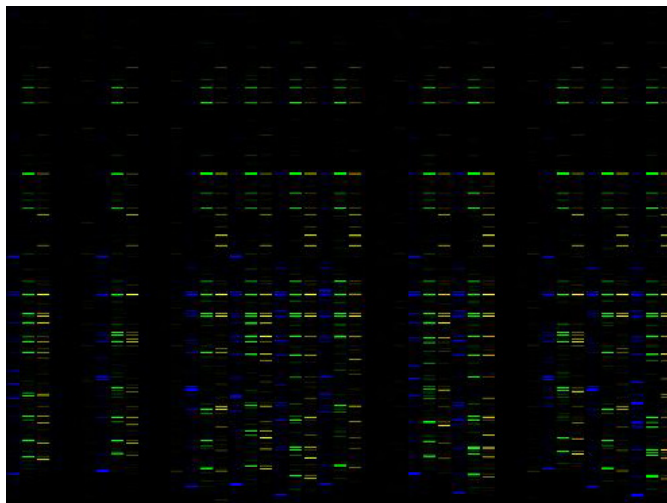


Imagem: Peter Ward Inglis



## Implantação de Metodologia Msap (*Methylation Sensitive Amplified Polymorphism*) para Análise Global de Diversidade Epigenética

Peter Ward Inglis<sup>1</sup>  
Joseane Padilha da Silva<sup>2</sup>  
Marília de Castro Rodrigues Pappas<sup>3</sup>  
Dario Grattapaglia<sup>4</sup>

### Introdução

A epigenética constitui o campo de estudo da informação herdável que não é explicada pela sequência de DNA (HAIG, 2004). Alterações moleculares que modificam o acesso da maquinaria de transcrição à cromatina, e assim modulam a expressão gênica, são descritas como marcas epigenéticas. A metilação do DNA é a primeira e mais bem caracterizada modificação epigenética e tem papel importante na regulação da expressão gênica, no desenvolvimento, na floração, na resposta a estresses, etc. (BOND et al., 2014). De maneira geral, a metilação do DNA causa silenciamento transcricional (CEDAR; BERGMAN, 2009). Marcas epigenéticas ou epialelos são parcialmente herdáveis, embora não se conheçam bem os mecanismos e a estabilidade dessa herança (NIEDERHUTH et al., 2014). Por outro lado, parte dessas marcas tem

comportamento dinâmico e, também por isso, tem papel crucial em situações de estresse que requerem rápida capacidade de adaptação (COLANERI et al., 2013). Sugere-se que o componente epigenético pode ser uma fonte da variação herdável (SPRINGER, 2013; YUAN et al., 2013) que, potencialmente, poderia explicar em parte a herdabilidade faltante (*missing heritability*), aquela que não é explicada a partir de variações da sequência do genoma.

A identificação de marcas epigenéticas representa mais um avanço na busca de marcas moleculares e pode, potencialmente, auxiliar na compreensão da atuação de elementos regulatórios da expressão, além de fornecer valiosas informações sobre a conservação e evolução desses mecanismos, sua função em diversos aspectos, como na capacidade adaptativa, plasticidade fenotípica e, assim, futuramente, indicar potenciais alvos para seleção de

<sup>1</sup> Biólogo, Ph.D, bolsista da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>2</sup> Estatística, mestra, pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>3</sup> Bióloga, doutora, pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>4</sup> Engenheiro florestal, Ph.D, pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

caracteres de interesse.

Algumas técnicas já foram desenvolvidas para estimar a metilação global, em sítios específicos ou em escala genômica, e diferem quanto às suas peculiaridades atendendo a aplicações diversas (LISTER e ECKER, 2009; ZILBERMAN e HENIKOFF, 2007). O sequenciamento em massa de DNA após tratamento com bissulfito de sódio é a técnica considerada o padrão ouro para identificação e mapeamento de citosinas metiladas no genoma com precisão, em escala genômica e que permite gerar os chamados metilomas (KRUEGER et al., 2012; NIEDERHUTH et al., 2014).

Com o objetivo de testar uma metodologia capaz de identificar potenciais marcadores moleculares associados à metilação do DNA sem conhecimento prévio da sequência de DNA do organismo estudado, com custo mais acessível do que técnicas que envolvem sequenciamento, optamos por adaptar a técnica de MSAP (*Methylation-Sensitive Amplified Polymorphism*) (XU et al., 2000; CERVERA et al., 2002). Essa metodologia tem o mesmo princípio do AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), uma técnica de *fingerprinting* multiloco em que polimorfismos de DNA são detectados a partir do tamanho dos fragmentos de DNA amplificados do DNA genômico digerido com enzimas de restrição (VOS et al., 1995; MUELLER et al., 1999). Na metodologia de AFLP, o DNA genômico é clivado com duas enzimas de restrição, uma de corte raro e outra de corte frequente e, posteriormente, ligado a adaptadores com terminais complementares às extremidades resultantes da clivagem pelas enzimas de restrição. É então realizada uma reação de PCR para a amplificação seletiva de fragmentos com oligonucleotídeos iniciadores específicos com sequência complementar aos adaptadores e bases arbitrárias adicionais na extremidade 3' que dão a capacidade seletiva da amplificação e reduzem a população de fragmentos gerados (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1996; MUELLER et al., 1999). No caso de MSAP, no entanto, em vez de se utilizar uma única enzima de corte frequente, utiliza-se um par de isosquisômeros com sensibilidade diferencial à metilação. A partir do protocolo de AFLP (VOS et al., 1995), adaptamos a técnica de MSAP utilizando a enzima de corte raro EcoRI (sítio de restrição G<sup>A</sup>AATTC) e o par de isosquisômeros (sítio de restrição C<sup>A</sup>CGG) MspI (insensível à metilação)

e HpaII (sensível à metilação). Implementamos a detecção com marcação fluorescente dos perfis de MSAP para análise automatizada dos perfis de MSAP. Neste comunicado, descrevemos o protocolo desenvolvido, a seleção dos oligonucleotídeos testados para geração de perfis de MSAP a partir de reações em paralelo de fragmentos de DNA gerados a partir da digestão com MspI e HpaII, a detecção e a análise dos perfis de MSAP.

## Material e Métodos

### Extração de DNA

A qualidade e pureza do DNA são de fundamental importância no desenvolvimento da técnica por terem grande influência na eficiência do processo de digestão enzimática e amplificação dos fragmentos e, consequentemente, na reprodutibilidade da técnica. A extração de DNA genômico de tecido foliar e de câmbio de *Eucalyptus grandis* foi conduzida utilizando-se adaptação de método descrito anteriormente, que inclui um pré-tratamento do tecido com solução contendo sorbitol para remoção de potenciais inibidores, como polifenóis e polissacarídeos (RUSSELL et al., 2010). Foram utilizadas amostras de tecido foliar em desenvolvimento (juvenil) e de folhas completamente desenvolvidas (adultas), além de câmbio em desenvolvimento, coletado da parte interior da casca do tronco a altura de cerca de 1 metro do solo. Árvores adultas de *E. grandis* foram utilizadas para a implementação dessa metodologia. Foram utilizadas amostras de folha completamente desenvolvidas de árvores adultas de uma família de cinco árvores geradas por autofecundação a partir de uma árvore mãe, incluindo esta. Destaca-se que uma dessas árvores provenientes de autofecundação, denominada BRASUZ, é a árvore cujo genoma foi sequenciado para o genoma de referência da espécie. Além dessas, foram utilizadas amostras de folha em desenvolvimento, completamente desenvolvidas e câmbio de cinco réplicas biológicas de árvores juvenis de BRASUZ. Essas cinco réplicas estão plantadas lado a lado no campo experimental da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF.

### Preparação do adaptador

A solução de uso de adaptadores é preparada em pares. Adaptadores EcoRI – EcoRI-Adaptador1 (5'-CTCGTAGACTGCGTACC) e EcoRI-Adaptador2 (5'-AATTGGTACGCAGTCTAC) (Tabela 1, VOS et al., 1995) – devem ser diluídos em uma única solução com concentração de 5  $\mu$ M em TE (tris – HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0). Adaptadores MspI/HpaII – MspI/HpaII-Adaptador1 (5'-GACGATGAGTCTAGAA) e MspI/HpaII-Adaptador2 (5'-CGTTCTAGACTCATC) (Tabela 1, XU et al., 2000) – devem ser diluídos em uma única solução com concentração final de 50  $\mu$ M em TE. Os pares de adaptadores são anelados entre si por aquecimento em termociclador a 95°C por 2 minutos, seguido de resfriamento de 0,5°C a cada 30 segundos até atingir a temperatura de 4°C. As soluções contendo os adaptadores anelados foram estocadas a -20°C.

## Digestão do DNA e ligação do adaptador

Uma etapa simultânea de digestão do DNA e ligação aos adaptadores previamente preparados – adaptador EcoRI adaptador MspI/HpaII (Tabela 3) – é realizada em paralelo para a digestão com cada uma das enzimas (MspI e HpaII). Cada reação consiste de tampão de T4 DNA ligase 1X, 50 mM de cloreto de sódio (NaCl), 0,05  $\mu$ g/ $\mu$ L de albumina bovina (BSA), uma unidade de T4 DNA ligase, 5 pmol dos adaptadores EcoRI, 50 pmol dos adaptadores MspI/HpaII, 5 unidades de EcoRI (foi utilizada EcoRI-HF high fidelity, NEB), 5 unidades de MspI ou HpaII e 100 ng de DNA genômico em 20  $\mu$ L de volume final. As reações são, inicialmente, aquecidas a 37°C por 2 horas, em seguida, mantidas a 17°C por uma hora e então resfriadas a 4°C por mais uma hora. As reações são diluídas cinco vezes em água e estocadas a -80°C.

**Tabela 1.** Adaptadores utilizados para ligação ao DNA digerido com as enzimas de restrição EcoRI + MspI ou EcoRI + HpaII.

| Adaptadores           | Sequência             |
|-----------------------|-----------------------|
| EcoRI-Adaptador1      | 5'-CTCGTAGACTGCGTACC  |
| EcoRI-Adaptador2      | 5'-AATTGGTACGCAGTCTAC |
| MspI/HpaII-Adaptador1 | 5'-GACGATGAGTCTAGAA   |
| MspI/HpaII-Adaptador2 | 5'-CGTTCTAGACTCATC    |

## PCR pré-seletiva

Uma reação de amplificação pré-seletiva é realizada utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores pré-seletivos EcoRI + A (5'-GACTGCGTACCAATTCA) e MspI/HpaII + T (5'-GATGAGTCTAGAACGGT). A reação consiste de tampão de PCR 1X, contendo 2 mM de cloreto de magnésio e 1 M de betaína, 0,25 mM de dNTPs, 0,5  $\mu$ M de cada oligonucleotídeo, 1 unidade de Taq polimerase e 2  $\mu$ L do DNA ligado aos adaptadores (diluído cinco vezes) em 20  $\mu$ L de volume final. Uma etapa inicial de 72°C por 2 minutos permite o preenchimento das extremidades dos adaptadores e é seguida de 20 ciclos de 94°C por 30 segundos, 56°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos e, então, 72°C por 2 minutos e 60°C por 30 minutos. A rampa é limitada a 1°C por segundo. Os produtos de reação são analisados em gel de agarose 1,5%, em que se espera observar um rastro sutil caso a reação tenha sido bem-sucedida. As reações são diluídas cinco vezes em água e estocadas a -20°C.

## PCR seletiva

A reação de amplificação seletiva reduz a complexidade genômica da reação pré-seletiva para produzir perfis de AFLP resolvíveis, utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores, abrangendo a parte central da sequência dos adaptadores EcoRI e MSPI/HpaII mais três nucleotídeos seletivos. Os oligonucleotídeos iniciadores EcoRI foram marcados com fluorescência para detecção automática dos perfis de AFLP em sequenciador de DNA. Os oligonucleotídeos seletivos EcoRI marcados e os MSPI/HpaII não marcados estão listados na Tabela 2.

Cada reação de PCR seletiva consiste de tampão de PCR 1X com 2 mM de cloreto de magnésio, 0,15  $\mu$ M de cada oligonucleotídeo MH-XXX e oligonucleotídeo marcado com fluorocromo EcoRI-XXX, 0,2 mM de dNTPs, 0,5 U de Taq polimerase e 2  $\mu$ L do produto da PCR pré-seletiva diluída. A reação tem um passo inicial de 94°C por 2 minutos, seguido de 10 ciclos de 94°C por 30 segundos, 66°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto. A temperatura de anelamento é gradativamente reduzida em 1°C por ciclo. Então são realizados 25 ciclos de 94°C por 30 segundos, 56°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto. Finalmente, as reações foram submetidas a 72°C por 3 minutos e 60°C por 30 minutos.

**Tabela 2.** Oligonucleotídeos iniciadores seletivos utilizados na análise de MSAP. Os nomes dos oligonucleotídeos se referem à enzima de restrição relacionada ao adaptador mais as três bases nucleotídicas seletivas adicionadas na extremidade 3'. A marcação fluorescente é indicada quando presente.

| Identificação do oligonucleotídeo | Sequência                   |
|-----------------------------------|-----------------------------|
| EcoRI-ACT FAM                     | 5'FAM + GACTGCGTACCAATTCAC  |
| EcoRI-ACA FAM                     | 5'FAM + GACTGCGTACCAATTCACA |
| EcoRI-AAC NED                     | 5'NED + GACTGCGTACCAATTCAAC |
| EcoRI-ACC NED                     | 5'NED + GACTGCGTACCAATTCAAC |
| EcoRI-AGC NED                     | 5'NED + GACTGCGTACCAATTCAAC |
| EcoRI-AAG VIC                     | 5'VIC + GACTGCGTACCAATTCAAG |
| EcoRI-AGG VIC                     | 5'VIC + GACTGCGTACCAATTCAAG |
| EcoRI-ACG VIC                     | 5'VIC + GACTGCGTACCAATTCAAG |
| EcoRI-AC FAM                      | 5'FAM + GACTGCGTACCAATTCAC  |
| EcoRI-AT NED                      | 5'NED + GACTGCGTACCAATTCAT  |
| EcoRI-AG VIC                      | 5'VIC + GACTGCGTACCAATTCAAG |
| EcoRI-AA VIC                      | 5'VIC + GACTGCGTACCAATTCAA  |
| MH + TAA                          | 5'-GATGAGTCTAGAACGGTAA      |
| MH + TCC                          | 5'-GATGAGTCTAGAACGGTCC      |
| MH + TAG                          | 5'-GATGAGTCTAGAACGGTAG      |
| MH + TAC                          | 5'-GATGAGTCTAGAACGGTAC      |
| MH + TGA                          | 5'-GATGAGTCTAGAACGGTGA      |
| MH + TTT                          | 5'-GATGAGTCTAGAACGGTTT      |
| MH + TAT                          | 5'-GATGAGTCTAGAACGGTAT      |
| MH + TGG                          | 5'-GATGAGTCTAGAACGGTGG      |
| MH + TTC                          | 5'-GATGAGTCTAGAACGGTTC      |
| MH + TTA                          | 5'-GATGAGTCTAGAACGGTTA      |

Uma seleção inicial de combinações de oligonucleotídeos EcoRI+3 e MspI/HpaII+3 foi realizada para duas amostras-teste de PCR pré-seletiva com o objetivo de identificar as combinações que geram perfis de bandas mais consistentes em termos de intensidade e separação de bandas de AFLP. As combinações selecionadas foram então utilizadas para amplificar as amostras digeridas com EcoRI+MspI e EcoRI+HpaII em paralelo. Um detalhe importante considerado foi a utilização do mesmo termociclador para cada combinação de oligonucleotídeos devido a variações observadas no padrão dos perfis de MSAP com o uso de termocicladores diferentes nas reações de PCR.

Os perfis de MSAP foram detectados em sequenciador automático ABI 3730 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems). As amostras foram preparadas para análise no sequenciador adicionando-se 1 µL do produto de PCR a 9,5 µL de formamida HiDi (Applied Biosystems) e 0,5 µL de marcador de peso molecular marcado com

fluorocromo ROX (BRONDANI; GRATTAPAGLIA, 2001). Antes da injeção no sequenciador, as amostras foram desnaturadas a 95°C por 5 minutos e imediatamente resfriadas em gelo.

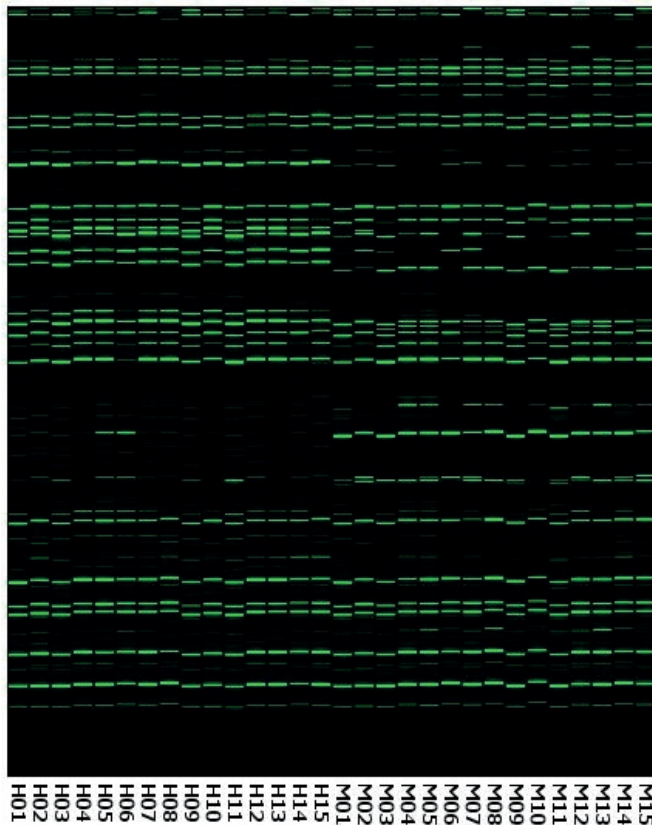
## Análise de dados

Os dados de MSAP foram inicialmente analisados com a utilização do programa *Genographer* v. 2.1.4 (BANKS; BENHAM, 2007), que representa graficamente um “pseudogel” a partir dos dados brutos do sequenciador, convertendo os picos de intensidade de fluorescência em bandas e, assim, por inspeção visual, foram detectadas falhas, amostras com problemas de amplificação e foi realizada a seleção inicial das combinações de oligonucleotídeos seletivos. A detecção dos picos de fluorescência correspondentes aos fragmentos de DNA que geram os perfis do MSAP foi realizada utilizando-se 50 rfu (unidade relativa de fluorescência) como linha de base de fluorescência com o emprego do programa *PeakScanner* v. 2 (APPLIED BIOSYSTEMS, 2016). Os dados assim filtrados foram então convertidos para uma matriz binária de presença e ausência de fragmento, representado pelo pico de fluorescência, utilizando-se o programa *RawGeno* (ARRIGO et al., 2012) considerando um limiar mínimo de 500 rfu para definição de bins. O número médio de alelos (fragmentos) após a filtração foi de 400 para uma amostragem de árvores de *E. grandis*, e seis combinações de oligonucleotídeos seletivos foram selecionadas para análise.

Para a interpretação dos resultados como a definição de alelos, os dados binários para as amostras digeridas com MspI e HpaII foram analisadas utilizando-se o pacote msap.R (v. 1.1.9) (PÉREZ-FIGUEROA, 2013). Fragmentos presentes em ambos os perfis (MspI e HpaII) são considerados não metilados; fragmentos presentes apenas no perfil de MspI são considerados totalmente metilados; fragmentos presentes apenas no perfil de HpaII são considerados hemimetilados; e fragmentos ausentes em ambos os perfis são considerados hipermetilados ou ausentes devido a polimorfismos de sequência naquela amostra. De acordo com essa classificação, os fragmentos ou alelos são separados quanto à susceptibilidade à metilação (representativo de variação epigenética) ou se não há evidência de metilação naquele loco (representativo de variação genética) de acordo com o padrão de fragmentos apresentados para cada



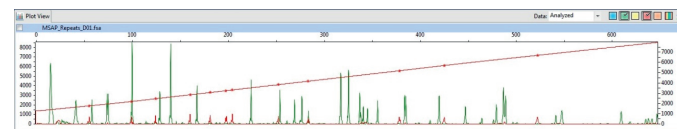
enzima e o nível de polimorfismo avaliado para cada categoria. Uma análise de ordenamento é realizada para os grupos de amostras inseridos no programa e representada em gráficos de coordenadas principais, auxiliando na interpretação da variação epigenética observada. Finalmente, análises estatísticas dão suporte às análises entre os grupos de amostras.



**Figura 1.** Imagem de gel simulada a partir dos dados de MSAP coletados em sequenciador automático ABI 3730 pelo programa *Genographer*. A combinação de oligonucleotídeos no exemplo é EcoRI-AAG VIC + MH + TAA (Tabela 2). As amostras estão identificadas usando prefixo H para digestão com HpaII e M para MspI.

Variáveis dicotômicas, tais como a presença ou ausência de fragmento, exigem a escolha de ferramentas estatísticas adequadas à sua natureza para que se possa ter segurança nas inferências. Nesse sentido, o pacote *msap.r* e a ANOVA logística univariada, seguida da análise de correspondência, foram as duas estratégias adotadas para estudar o efeito dos grupos sobre a presença ou ausência de fragmento. No pacote *msap.r*, calcula-se a matriz de similaridade com base na distância não euclidiana e, então, faz-se a análise de coordenadas principais (PCOA). Para a outra estratégia adotada, inicialmente faz-se uma ANOVA logística univariada para relacionar os grupos com a resposta de cada

fragmento e, com base no p-valor obtido, separam-se os fragmentos em grupos de significância ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.05$ ,  $P < 0.10$ ,  $P < 0.25$ ,  $P < 0.50$ ,  $P < 0.75$  e  $P < 1$ ). Com base no conjunto de dados de cada um dos grupos de significância, faz-se a análise de correspondência multivariada e calcula-se a porcentagem da variabilidade total dos dados que as duas primeiras dimensões explicam. Por fim, seleciona-se o grupo que melhor consegue explicar a variabilidade dos dados e apresenta-se o biplot baseado na análise correspondência. Essa última estratégia tem a vantagem de permitir explorar como os fragmentos se relacionam na separação dos grupos.



**Figura 2.** Exemplo da visualização de um perfil de picos de fluorescência para uma amostra com o uso do programa *Peakscanner*. Os picos em verde representam os fragmentos do MSAP, e em vermelho o marcador de peso molecular.

## Resultados e Discussão

Para o desenvolvimento do experimento, foram utilizadas cinco réplicas biológicas da planta que deu origem ao genoma de *E. grandis* (BRASUZ) plantadas no campo experimental da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Brasília, DF) com amostras de tecido foliar em desenvolvimento (Y), folhas completamente desenvolvidas (O) e amostras de câmbio em desenvolvimento (C). Além das réplicas de Brasília, foram utilizadas amostras de tecido foliar de folhas completamente desenvolvidas de árvores adultas plantadas em Itapetininga, São Paulo, de uma réplica biológica de BRASUZ (representada no gráfico como D), de quatro árvores irmãs (representadas no gráfico como *Siblings*) e a árvore mãe (M).

Os resultados obtidos a partir do pacote *msap.R* revelam que, de um total de 318 locos (fragmentos) analisados, 158 locos são susceptíveis à metilação (MSL) e 160 não associados à metilação (NML). O número de locos polimórficos foi de 67 (42%) dos susceptíveis à metilação e 48 (30%) dos não associados à metilação. O índice de diversidade de Shannon foi de 0,52 (desvio padrão 0,15) para MSL e 0,33 (desvio padrão 0,17) para NML, corroborando a presença de maior diversidade epigenética do que

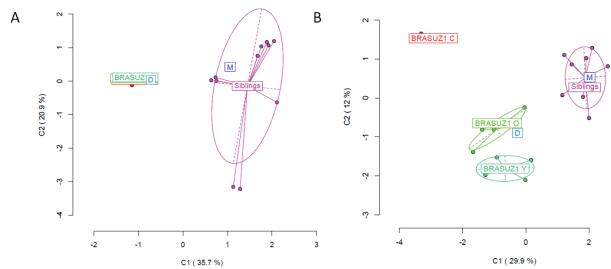
genética nas amostras, conforme esperado, uma vez que as amostras são diretamente relacionadas (árvores mãe e filhas). Os níveis de metilação foram computados para cada perfil de metilação (não metilado, hemimetilado, metilado e hipermetilado ou ausente) e mostram variação entre tecidos e maior consistência entre as amostras de folha (Tabela 3).

**Tabela 3.** Níveis de metilação por amostra para locos não metilados, hemimetilados, metilados e hipermetilado ou ausente. Dados de BRASUZ Bsb (Brasília) são consolidados de 5 réplicas biológicas.

| Níveis de metilação                  | BRASUZ Bsb câmbio | BRASUZ Bsb folha juvenil | BRASUZ Bsb folha | BRASUZ SP folha | M (mãe) folha | Siblings folha |
|--------------------------------------|-------------------|--------------------------|------------------|-----------------|---------------|----------------|
| HPA + /MSP + (não metilado)          | 0,2937            | 0,2354                   | 0,2519           | 0,1835          | 0,1582        | 0,1766         |
| HPA + /MSP- (hemimetilado)           | 0,2367            | 0,2987                   | 0,3025           | 0,3101          | 0,3418        | 0,3262         |
| HPA-/MSP + (metilado)                | 0,2380            | 0,3430                   | 0,3101           | 0,2975          | 0,3924        | 0,3510         |
| HPA-/MSP- (hipermetilado ou ausente) | 0,2316            | 0,1228                   | 0,1354           | 0,2089          | 0,1076        | 0,1461         |

Uma análise de coordenadas principais a partir de dados de locos não associados à metilação, ou seja, refletindo apenas a variação genética observada, revela a ancestralidade das amostras. Réplicas da árvore BRASUZ de Brasília e de São Paulo (BRASUZ e D, respectivamente), incluindo DNA de folhas em diferentes estágios de desenvolvimento e câmbio, são agrupadas como um grupo único. As amostras de folha completamente desenvolvida da mãe (M) e dos irmãos de BRASUZ (*Siblings*) formam outro grupo, em que se pode observar dispersão entre a mãe e as árvores irmãs (Figura 3A). Como pode ser observado na Figura 3, pela soma das porcentagens apresentadas nos eixos x e y, cerca de 57% da variância observada são explicados por essa representação gráfica. Por outro lado, incluindo os marcadores associados à metilação na análise, assim representando as variações genética e epigenética, observa-se maior variabilidade entre as amostras com a separação das réplicas de BRASUZ (1 e D) em três grupos distintos por tecido – câmbio (C), folha em desenvolvimento (Y) e completamente desenvolvida (O) –, enquanto as amostras das árvores mãe e irmãos (todas de folha completamente desenvolvida) permanecem formando um grupo distinto (Figura 3B). Embora apenas cerca de 42% da variância seja explicada por essa representação, a interpretação dessas imagens sugere que exista variabilidade epigenética entre tecidos, conforme esperado, uma vez que tecidos de um mesmo genótipo (réplicas biológicas de BRASUZ, mesmo que provenientes de

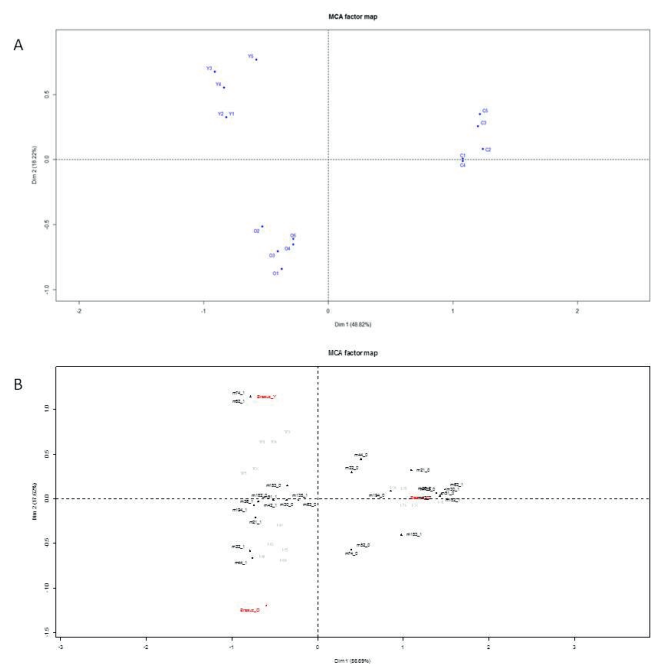
ambientes distintos) aparecem separadamente no gráfico. Essa maior diversidade pode ser quantificada pelo resultado de uma análise molecular de variância (ANOVA), que mostra o índice diversidade dos dados associados à metilação maior do que para os dados não associados à metilação –  $\Phi_{ST}=0,4538$  ( $P<0,0001$ ) e  $\Phi_{ST}=0,2909$  ( $P= 0,001$ ), respectivamente.



**Figura 3.** Análise de coordenadas principais (PCoA) a partir de dados de locos MSAP não associados (A) e associados à metilação (B) de amostras de *Eucalyptus grandis*, incluindo tecidos distintos de réplicas de BRASUZ provenientes de Brasília (BRASUZ1 C – câmbio, BRASUZ1 Y – folha juvenil, BRASUZ1 O – folha completamente desenvolvida); de folha de réplica de BRASUZ proveniente de São Paulo (D); de folha das árvores mãe (M) e irmãos de BRASUZ (*Siblings*). Cada cor representa uma amostra e/ou genótipo, e pontos da mesma cor representam réplicas biológicas do mesmo genótipo.

Os resultados da ANOVA logística univariada para as cinco réplicas biológicas de BRASUZ, plantadas lado a lado em Brasília, mostram que há 14 fragmentos, 33% de um total de 43 fragmentos, em que há diferença significativa ( $p<0.01$ ) entre os grupos quanto à metilação. Esses 14 fragmentos explicam 67% da variância observada. Considerando apenas esses fragmentos com significância de 1%, a visualização dessa análise de correspondência multivariada em biplot mostra que há separação das amostras em três grupos de acordo com os tecidos e também a fase de desenvolvimento amostrados (folha em desenvolvimento, folha completamente desenvolvida e câmbio) (Figura 4A). Na Figura 4B, pode-se observar, pelo padrão de metilação desses 14 fragmentos, o padrão inverso de metilação de cada loco para folha (nos dois quadrantes à esquerda) e câmbio (dois quadrantes à direita). Ou seja, quando um determinado fragmento está metilado em folha, não está em câmbio e vice-versa. Alguns poucos locos parecem distinguir claramente as amostras de folha em estágios de desenvolvimento distintos, como os fragmentos m74 e m52 para folha em desenvolvimento, e m22 e m44 para folha completamente desenvol-

vida. Os demais fragmentos parecem mais determinantes na distinção entre tecidos (folha e câmbio) do que entre estágios de desenvolvimento de folha. A distribuição dos fragmentos no biplote acontece claramente entre os lados positivo e negativo da primeira dimensão (eixo x) com os padrões de metilação coincidentes para folhas (em desenvolvimento e completamente desenvolvidas) e padrão inverso para câmbio. Por outro lado, quando se observam os lados positivo e negativo da segunda dimensão (eixo y), a maior parte dos fragmentos mostra pouca ou nenhuma variação entre folha em desenvolvimento e folha completamente desenvolvida.



**Figura 4.** Biplotes para análise de correspondência multivariada para cinco réplicas biológicas de BRASUZ plantadas na Embrapa, considerando somente as bandas que apresentaram p-valor menor que 0,01 no modelo logístico univariado. Amostras das cinco réplicas se agrupam por tipo de tecido e fase de desenvolvimento: folha em desenvolvimento (Y1 a Y5), folha completamente desenvolvida (O1 a O5) e câmbio (C1 a C5) (A). Padrão de metilação dos 14 fragmentos destacado em preto – 1 (banda metilada), 0 (não metilada) – para as amostras indicadas em vermelho: BRASUZ\_Y (folha em desenvolvimento), BRASUZ\_O (folha desenvolvida) e BRASUZ\_C (câmbio) (B).

**Tabela 4.** Número absoluto de bandas e porcentagem de explicação das duas primeiras dimensões da análise de correspondência multivariada, segundo o grupo de significância estatística obtido por meio do do modelo logístico para as amostras de tecido foliar em dois estágios de desenvolvimento e câmbio das 5 réplicas de BRASUZ plantadas no Embrapa (Brasília, DF).

| Grupo  | Nº de Bandas | % Explicação das Dimensões |        |
|--------|--------------|----------------------------|--------|
| P<0.01 | 14           | 33%                        | 67,04% |
| P<0.05 | 19           | 44%                        | 62,23% |
| P<0.10 | 22           | 51%                        | 58,63% |
| P<0.25 | 24           | 56%                        | 49,02% |
| P<0.5  | 35           | 81%                        | 49,02% |
| P<1    | 43           | 100%                       | 49,02% |

### Conclusões

A metodologia MSAP, implantada e testada com amostras de tecidos em estágio de desenvolvimento diferentes de réplicas biológicas de um mesmo genótipo de um exemplar de *Eucalyptus grandis*, mostrou-se capaz de amostrar variações significativas capazes de separar as amostras por tipo de tecido e estágio de desenvolvimento, mesmo com um pequeno grupo de fragmentos sensíveis à metilação amostrados aleatoriamente no genoma. A variação no padrão de metilação entre tecidos é conhecida (WIDMAN et al., 2014; KING, 2015; NIEDERHUTH et al., 2016; DOWEN et al., 2012) e, por isso, foram utilizados tecidos e fases de desenvolvimento distintos para testar a capacidade da técnica de amostrar essa diversidade epigenética associada à metilação do DNA. Por outro lado, o uso de réplicas biológicas de um mesmo genótipo teve o objetivo de testar a reprodutibilidade da metodologia. A possibilidade de analisar isoladamente locos associados e não associados à metilação reforçam o poder da técnica de amostrar a maior diversidade epigenética esperada quando comparada à diversidade genética com variações significativas entre os tecidos.

Embora apresente alguns problemas de repetibilidade, a técnica mostra-se útil para avaliar a diversidade epigenética de maneira global de amostras preparadas e analisadas em paralelo, sem a necessidade de sequenciamento e sem conhecimento prévio de sequência da espécie estudada. Portanto, apresenta uma excelente opção quando se pretende fazer estudos preliminares de padrão de metilação global para

espécies para as quais não há recursos genômicos disponíveis.

## Referências Bibliográficas

APPLIED Biosystems. **PeakScanner**. Disponível em: <http://www.appliedbiosystems.com/peakscanner.html>. Acesso em: nov. 2016.

ARRIGO, N.; HOLDEREGGER, R.; ALVAREZ, N. Automated Scoring of AFLPs Using RawGeno v 2.0, a Free R CRAN Library. **Methods in Molecular Biology**, v. 888, p. 155-175, 2012.

BANKS, T. W.; BENHAM, J. J. **Genographer**, version 2.1.4. 2008. Disponível em: <http://sourceforge.net/projects/genographer>. Acesso em: nov. 2016.

BOND, D. M.; BAULCOMBE, D. C. Small RNAs and heritable epigenetic variation in plants. **Trends in cell biology**, v. 24, n. 2, p. 100-7, 2014.

BRONDANI, R. P. V.; GRATTAPAGLIA, D. Cost-effective method to synthesize a fluorescent internal dna standard for automated fragment sizing. **Biotechniques**, v. 31, n. 4, p. 802-810, 2001.

CEDAR, H.; BERGMAN, Y. Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. **Nature reviews. Genetics**, v. 10, n. 5, p. 295-304, 2009.

CERVERA, M. T.; RUIZ-GARCÍA, A. L.; MARTIEZ-ZAPATER, J. M. Analysis of DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* based on methylation-sensitive AFLP markers. **Molecular Genetics and Genomics**, 268, p. 543-552, 2002.

COLANERI, A. C.; JONES, A. M. Genome-Wide Quantitative Identification of DNA Differentially Methylated Sites in *Arabidopsis* Seedlings Growing at Different Water Potential. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, 2013.

DOWEN, R. H.; PELIZZOLA, M.; SCHMITZ, R. J.; LISTER, R.; DOWEN, J. M.; NERY, J. R.; DIXON, J. E.; ECKER, J. R. 2012. Widespread dynamic DNA methylation in response to biotic stress. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 32, 2012.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220 p. (EMBRAPA CENARGEN. Documentos, 20).

HAIG, D. The (dual) origin of epigenetics. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v. 69, p. 67-70, 2004.

KING, G. J. Crop epigenetics and the molecular hardware of genotype × environment interactions. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 968, 2015.

KRUEGER, F.; KRECK, B.; FRANKE, A.; ANDREWS, S. R. DNA methylome analysis using short bisulfite sequencing data. **Nature methods**, v. 9, n. 2, p. 145-51, 2012.

LISTER, R.; ECKER, J. R. Finding the fifth base: genome-wide sequencing of cytosine methylation. **Genome research**, v. 19, n. 6, p. 959-66, 2009.

MUELLER, U. G.; WOLFENBARGER, L. L. AFLP genotyping and fingerprinting. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 14, n. 10, p. 389-394. 1999.

NIEDERHUTH, C. E.; SCHMITZ, R. J. Covering your bases: inheritance of DNA methylation in plant genomes. **Molecular Plant**, v. 7, n. 3, p. 472-80, 2014.

NIEDERHUTH, C. E. et al. Widespread natural variation of DNA methylation within angiosperms. **Genome Biology**, v. 17, n. 1, p. 194, 2016.

PÉREZ-FIGUEROA, A. MSAP: a tool for the statistical analysis of methylation-sensitive amplified polymorphism data. **Molecular Ecology Resources**, v. 13, n. 3, p. 522-527, 2013.

RUSSELL, A. et al. Phylogenetics and cytology of a pantropical orchid genus *Polystachya* (Polystachyinae, Vandaeae, Orchidaceae): evidence from plastid DNA sequence data. **Taxon**, v. 59, n. 2, p. 389-404, 2010.

SPRINGER, N. M., 2013. Epigenetics and crop improvement. **Trends in genetics**, v. 29, n. 4, p. 241-7, 2013.

VOS, P. et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, v. 23, n. 21,



p. 4407-14, 1995.

WIDMAN, N.; FENG, S.; JACOBSEN, S. E.; PELLEGRINI, M. Epigenetic differences between shoots and roots in *Arabidopsis* reveals tissue-specific regulation. **Epigenetics**, v. 9, n. 2, p. 236-242. 2014.

XU, M.; LI, X.; KORBAN, S. S. AFLP-Based detection of DNA methylation. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 18, n. 4, p. 361-368, 2000.

YUAN, L.; LIU, X.; LUO, M.; YANG, S.; WU, K. Involvement of histone modifications in plant abiotic stress responses. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 55, n. 10, p. 892-901, 2013.

ZILBERMAN, D.; HENIKOFF, S. Genome-wide analysis of DNA methylation patterns. **Development**, v. 134, n. 22, p. 3959-65, 2007.

## **Comunicado Técnico 203**

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:

**Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**

**Endereço:** Parque Estação Biológica (PqEB) - Avenida W5  
Norte - Caixa Postal 02372 - Brasília, DF, Brasil  
CEP: 70770-900

**Fone:** (61) 3448-4700

**Fax:** (61) 3340-3624

**E-mail:** [sac@cenargen.embrapa.br](mailto:sac@cenargen.embrapa.br)

**1ª edição**

Publicação *online* (2016)

MINISTÉRIO DA  
AGRICULTURA, PECUÁRIA  
E ABASTECIMENTO



## **Comitê Local de Publicações**

**Presidente:** Maria Isabela Lourenço Barbirato

**Secretário-Executivo:** Thales Lima Rocha

**Membros:** Daniela Aguiar de Souza Kols, Lígia Sardinha Fortes,  
Lucas Machado de Souza, Márcio Martinello Sanches, Rosamires  
Rocha Galvão

**Membros suplentes:** Ana Flávia do Nascimento Dias Côrtes,  
João Batista Tavares da Silva

## **Expediente**

**Normalização bibliográfica:** Ana Flávia do N. Dias Côrtes

**Revisão de texto:** José Cesamildo Cruz Magalhães

**Tratamento das imagens:** José Cesamildo Cruz Magalhães

**Editoração eletrônica:** José Cesamildo Cruz Magalhães